





(6)

11

90/カインチン、0.1mg/βペレリン、200/βシヨ糖)に  
移し、25°C、暗黒下で120rpmで振盪することによって懸  
濁培養細胞を得た。なお、培地の更新は1週間毎に行っ  
た。

(2) Tiプラスミド (バイナリーベクター)  
ハイグロマイシン抵抗性遺伝子 (hpt) 及びβ-D-  
グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子をTiプラスミドのT-D  
領域に組み込んだ。以下のプラスミドを構築した。  
(i) pG21H:ヒマのカラギーゼ遺伝子の第1イント  
ロンを含むGUS遺伝子、ハイグロマイシン抵抗性遺伝  
子と連結したプラスミド (中村ら、1991、植物バイオテ  
クノロジーII (現代化学増刊、pp.123-132)、名古屋  
大学、中村氏より入手)。

(ii) pTKQ32:  
1.イントロンのGUS及びハイグロマイシン抵抗性遺伝子の  
中間ベクター-pTKQ29への導入

Tn由来のスクベクチノマイシン抵抗性遺伝子を含むC1a  
1断片 (2.5kb) をクレノー処理により末端を平滑化  
し、これをpG21HのSma I部位に挿入し、アンピシリン及  
びスクベクチノマイシン抵抗性遺伝子を持つプラスミドpT  
Q307 (5.2kb) を得た。pTKQ32をEcoR I、Hind IIIで  
処理し、スクベクチノマイシン抵抗性遺伝子を含む2.5kb  
断片をpG48QのEcoR I、Hind III断片 (2.7kb) と連結  
し、スクベクチノマイシン抵抗性遺伝子とHind III、Hpa  
I断片を含むpTKQ70 (5.2kb) を得た。

355プロモーターにヒマのカラギーゼの第1イントロ  
ンとGUS遺伝子とを連結したベクター-pG21H (Ohta S et al  
1, 1990/Plant Cell Physiol. 31: 805-813、名古屋大学  
中村氏より譲渡) をEcoR Iで切断後クレノー酵素により  
末端を平滑化したHind III断片 (pGACTTC; カラギー  
ゼコード4660P) を挿入した。355プロモーター及びびン  
トロQUSを含む断片をHind IIIにより切り出し、355プ  
ロモーターにハイグロマイシン抵抗性遺伝子を連結した  
プラスミドpG21H (J. Paszkowski, Friedrich Miescher In  
stituteより入手) のHind III部位に挿入しpG21-IG  
(7.6kb) を得た。なお、pG21HはpH51 (Pietrazak et al  
1, 1988/Nucleic Acids Research 15: 587-588) にハ  
イグロマイシン抵抗性遺伝子 (Gritz L and Davis J, 19  
83/Genes 3: 179-188) の挿入したものである。pTKQ70  
をHpa Iで処理して得られた断片をpG21-IGのPvu II断片  
(5.2kb) と連結しpTKQ29 (10.1kb) を得た。

2) スーパーバイナリー-変異体pTKQ29への導入  
バイナリーベクターに変異体pTKQ29の導入  
8由来のvtrA, vtrC, vtrD遺伝子と挿入して得たスーパ  
ーバイナリーベクター-pTKQ29への目的遺伝子 (ハイグ  
ロマイシン抵抗性遺伝子、イントロンのGUS遺伝子) の導  
入は相同組換えによって行った。すなわち、両ベクター  
には相同組換えによって行われた断片をpG21-IGのPvu II断片  
をHpa Iで処理して得られた断片をpG21-IGのPvu II断片  
(5.2kb) と連結しpTKQ29 (10.1kb) を得た。

3) スーパーバイナリー-変異体pTKQ29への導入  
バイナリーベクターに変異体pTKQ29の導入  
8由来のvtrA, vtrC, vtrD遺伝子と挿入して得たスーパ  
ーバイナリーベクター-pTKQ29への目的遺伝子 (ハイグ  
ロマイシン抵抗性遺伝子、イントロンのGUS遺伝子) の導  
入は相同組換えによって行われた断片をpG21-IGのPvu II断片  
をHpa Iで処理して得られた断片をpG21-IGのPvu II断片  
(5.2kb) と連結しpTKQ29 (10.1kb) を得た。

特許2649287

(5)

10

培養することにより形質転換を行うこともできる。この  
よりに、本発明の方法では、培養組織を酵素処理や傷つ  
ける等の前処理を行わずに形質転換に供することのでき  
る。

形質転換に供した培養組織は、その後、脱分化過程  
又は脱分化状態で形質転換組織又は形質転換組織を誘発  
することにより、これは当該培養組織をオオキシン  
ン、サイトカニン等の植物生長調節物質を含み、ハイ  
グロマイシン等の選抜マーカー及びハイグロマイシン抵抗  
性遺伝子と連結したプラスミド (中村ら、1991、植物バイオテ  
クノロジーII (現代化学増刊、pp.123-132)、名古屋  
大学、中村氏より入手) により行うことができる。

選抜した細胞又は組織は公知の方法により再分化培養  
を行うことができる。これにより、形質転換により所望  
の形質を獲得した植物体を再生することができる。

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明す  
る。もともと、本発明は下記実施例に限定されるもの  
ではない。

実施例1

(i) 胚盤、胚盤組織

イネの完熟種子を70%エタノールで1分間、1%次亜  
塩酸ナトリウム3に0分間浸漬することによって消毒  
した後、2%固体培地 (No.6無菌培地及びビタミン類 (C  
hu C.C.1978/Proc. Symp. Plant Tissue Culture, Science  
Press Beijing, pp. 43-50)、100/βシヨ糖、200/βシヨ糖、  
2.4-D、300/βシヨ糖、200/βシヨ糖) に置かれた。  
また、完熟種子を起床後4日に種子より胚盤組織を摘  
出し胚盤として供試した。完熟種子を約3週間培養後、  
形成された胚盤由来のカルスを2%培地に移植し、4〜  
7日経過したカルスを胚盤カルスとして用いた。

(ii) 胚盤、胚盤組織

イネの完熟種子を上記の方法で消毒した後、1/2%固  
体培地 (1/2%のNo.6の主要無菌培地及び微量塩類、N6ビ  
タミン類、100/βシヨ糖、200/βシヨ糖、200/βシヨ糖、  
2.4-D、300/βシヨ糖、200/βシヨ糖) に置かれた。  
また、完熟種子を起床後4日に種子より胚盤組織を摘  
出し胚盤として供試した。完熟種子を約3週間培養後、  
形成された胚盤由来のカルスを2%培地に移植し、4〜  
7日経過したカルスを胚盤カルスとして用いた。

(iii) 茎頂組織

イネの完熟種子を上記の方法で消毒した後、1/2%固  
体培地 (1/2%のNo.6の主要無菌培地及び微量塩類、N6ビ  
タミン類、100/βシヨ糖、200/βシヨ糖、200/βシヨ糖、  
2.4-D、300/βシヨ糖、200/βシヨ糖) に置かれた。  
また、完熟種子を起床後4日に種子より胚盤組織を摘  
出し胚盤として供試した。完熟種子を約3週間培養後、  
形成された胚盤由来のカルスを2%培地に移植し、4〜  
7日経過したカルスを胚盤カルスとして用いた。

(iv) 幼根組織、幼根カルス

イネの完熟種子を上記の方法で消毒した後、1/2%固  
体培地 (1/2%のNo.6の主要無菌培地及び微量塩類、N6ビ  
タミン類、100/βシヨ糖、200/βシヨ糖、200/βシヨ糖、  
2.4-D、300/βシヨ糖、200/βシヨ糖) に置かれた。  
また、完熟種子を起床後4日に種子より胚盤組織を摘  
出し胚盤として供試した。完熟種子を約3週間培養後、  
形成された胚盤由来のカルスを2%培地に移植し、4〜  
7日経過したカルスを胚盤カルスとして用いた。

(v) 幼根組織、幼根カルス

イネの完熟種子を上記の方法で消毒した後、1/2%固  
体培地 (1/2%のNo.6の主要無菌培地及び微量塩類、N6ビ  
タミン類、100/βシヨ糖、200/βシヨ糖、200/βシヨ糖、  
2.4-D、300/βシヨ糖、200/βシヨ糖) に置かれた。  
また、完熟種子を起床後4日に種子より胚盤組織を摘  
出し胚盤として供試した。完熟種子を約3週間培養後、  
形成された胚盤由来のカルスを2%培地に移植し、4〜  
7日経過したカルスを胚盤カルスとして用いた。

(vi) 幼根組織、幼根カルス

イネの完熟種子を上記の方法で消毒した後、1/2%固  
体培地 (1/2%のNo.6の主要無菌培地及び微量塩類、N6ビ  
タミン類、100/βシヨ糖、200/βシヨ糖、200/βシヨ糖、  
2.4-D、300/βシヨ糖、200/βシヨ糖) に置かれた。  
また、完熟種子を起床後4日に種子より胚盤組織を摘  
出し胚盤として供試した。完熟種子を約3週間培養後、  
形成された胚盤由来のカルスを2%培地に移植し、4〜  
7日経過したカルスを胚盤カルスとして用いた。

(vii) 幼根組織、幼根カルス

イネの完熟種子を上記の方法で消毒した後、1/2%固  
体培地 (1/2%のNo.6の主要無菌培地及び微量塩類、N6ビ  
タミン類、100/βシヨ糖、200/βシヨ糖、200/βシヨ糖、  
2.4-D、300/βシヨ糖、200/βシヨ糖) に置かれた。  
また、完熟種子を起床後4日に種子より胚盤組織を摘  
出し胚盤として供試した。完熟種子を約3週間培養後、  
形成された胚盤由来のカルスを2%培地に移植し、4〜  
7日経過したカルスを胚盤カルスとして用いた。

(viii) 幼根組織、幼根カルス

イネの完熟種子を上記の方法で消毒した後、1/2%固  
体培地 (1/2%のNo.6の主要無菌培地及び微量塩類、N6ビ  
タミン類、100/βシヨ糖、200/βシヨ糖、200/βシヨ糖、  
2.4-D、300/βシヨ糖、200/βシヨ糖) に置かれた。  
また、完熟種子を起床後4日に種子より胚盤組織を摘  
出し胚盤として供試した。完熟種子を約3週間培養後、  
形成された胚盤由来のカルスを2%培地に移植し、4〜  
7日経過したカルスを胚盤カルスとして用いた。

(ix) 幼根組織、幼根カルス

イネの完熟種子を上記の方法で消毒した後、1/2%固  
体培地 (1/2%のNo.6の主要無菌培地及び微量塩類、N6ビ  
タミン類、100/βシヨ糖、200/βシヨ糖、200/βシヨ糖、  
2.4-D、300/βシヨ糖、200/βシヨ糖) に置かれた。  
また、完熟種子を起床後4日に種子より胚盤組織を摘  
出し胚盤として供試した。完熟種子を約3週間培養後、  
形成された胚盤由来のカルスを2%培地に移植し、4〜  
7日経過したカルスを胚盤カルスとして用いた。

30 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000



表4 アグロバクテリウムの変異の多い系統による形質転換効率の違い(胚盤カス)

品名	ハイグロマイシン抵抗性カス数/如理カス数(%)			
	LB4404 (pIG121lm)	EH101 (pIG121lm)	LB4404 (pIG121lm)	LB4404 (pIG121lm)
月の光 1	91/338(27)	130/301(43)	169/305(55)	
月の光 2	59/421(14)	88/425(21)	110/393(28)	
月の光 3		10/521(2)	174/644(27)	
月の光 4		20/249(8)	100/248(29)	
コンヒカリ	1	6/283(2)		65/283(23)

(15) ハイグロマイシン耐性形質転換体におけるQ5遺伝子の発現様式

このようにして得られた抵抗性カスをさらに2次選抜にかけ、抵抗性カスから個体を増殖させた。再分化用の培地MS3にハイグロマイシンを添加した区と無添加の区を設定したが、無添加の場合には、Q5活性がない個体あるいはキメラ状態に活性を示す個体が多数出現した。しかし、再分化培地にハイグロマイシンを添加した場合はこのような個体は大幅に減少し、個体全体でQ5活性を示す再生個体が増加した(表5、表8、表7)。なお、アグロバクテリウムで処理しなかった場合には、ハイグロマイシン抵抗性あるいはQ5活性を示す個体は得られなかった。従って、このようなハイグロマイシン抵抗性カスから再生したQ5活性を全面に示す個体は形質転換体と考えられる。

表5 ハイグロマイシン抵抗性カスから再分化した個体におけるQ5遺伝子の発現(品種: 朝の光)

再分化 個体数	Q5遺伝子の発現	
	安定性	キメラ
1	25	1
2	7	1

(16) 再分化まで培地にはハイグロマイシンを添加

232) はヘルパープラスミドのvi領域は通常型であるが、バイナリーベクターに強顕原性アグロバクテリウムQ5のvi領域の一部の遺伝子を持つ。そして、このバイナリーベクターはpOK12から派生したもので、LB4404 (pOK12) は双子葉植物の中でも形質転換の困難な植物種に極めて高効率で形質転換を可能とした (Saito Y. et al., 1992; Theor. Appl. Genet. 83: 679-683)。このように、強顕原性のvi領域の存在そのもの、あるいは存在形態は形質転換の効率に大きく影響する可能性がある。そこで、強顕原性のvi領域の存在に異なる上記の3種類のアグロバクテリウムを用いて、Q5遺伝子の発現に関する導入効率を比較した。なお、供試材料はコンヒカリ、月の光の胚盤カスである。

強顕原性のvi領域を持たないLB4404 (pIG121lm) でも同品種ともQ5活性を示す組織が認められたが、コンヒカリではその率は30%程度と低かった。ヘルパープラスミドに強顕原性のvi領域を持つEH101 (pIG121lm) ではコンヒカリの導入率はやや上昇した。バイナリーベクターに強顕原性のvi領域を持つLB4404 (pOK32) ではコンヒカリでも月の光と同様に9%以上の組織でQ5活性が認められた(表3)。さらに、Q5活性を示すそれぞれ組織での青色領域の面積に関しては、LB4404 (pOK2) で最も大きく、高い導入率を示すことが観察された。

(14) 宿主の多いによる選抜効率(ハイグロマイシン耐性カス)

上項と同じ3つの置系を用いて、月の光、コンヒカリの胚盤カスとの共存培養後のハイグロマイシン抵抗性カスの選抜率に関する比較を行った。抵抗性カスの出現率に関してはLB4404 (pOK32) が最も高く、抵抗性カスの選抜率に関する品種間差異は認められなかった(表4)。LB4404 (pIG121lm) あるいはEH101 (pIG121lm) の2つの置系では、選抜率は低く、さらに培養困難なコンヒカリではハイグロマイシン抵抗性カスの出現率は2%程度にとどまった。従って、イネの形質転換に用いるアグロバクテリウムとしてはバイナリーベクターに強顕原性のvi領域の一部を持つLB4404 (pOK23) が最も優れていると判定される。

表6 ハイグロマイシン抵抗性カスから再分化した植物におけるQ5遺伝子の発現(品種: 月の光)

供試品系	系統数		
	供試ハイグロマイシン抵抗性カス	植物体再生カス	再生植物体Q5遺伝性
LB4404 (pIG121lm)	3	1	1
EH101 (pIG121lm)	20	17	10
LB4404 (pIG121lm)	20	15	12

(17) 再分化まで培地にはハイグロマイシンを添加

表7 ハイグロマイシン抵抗性カスから再分化した植物におけるQ5遺伝子の発現(品種: 朝の光)

供試品系	系統数		
	供試ハイグロマイシン抵抗性カス	植物体再生カス	再生植物体Q5遺伝性
LB4404 (pIG121lm)	19	6	3
EH101 (pIG121lm)	11	4	1
LB4404 (pIG121lm)	19	11	11

(18) 再分化まで培地にはハイグロマイシンを添加

(16) 形質転換体の増殖および種子増殖  
得られた形質転換体は、温室内で増殖することにより正常な生育を示し、外観からイボ体や奇形を示す個体は全く認められなかった。種子増殖についても、一部に部分不結や完全不結を示す個体もみられたが、大部分の個体は正常な増殖を示した。

(17) 形質転換当世代および次世代における導入遺伝子の発現と分析

形質転換体の全DNAをHind IIIで切断したDNA断片に対して、HPT遺伝子をプローブとしたサザン法により形質転換体当世代における導入遺伝子の検出を行った。その結果、供試した全ての個体で1〜数コピーの導入遺伝子の存在が認められた(表8、表9)。プラスミドpOK23の中ではHPT遺伝子を含むHind III断片は5.5kbであるのに対し、供試したすべての形質転換体には、約6kb以上のバンドが認められた。このことは、T-DNAが植物染色体へ組み込まれたことを裏付けるものである。なお、検出されたDNA断片の長さが個体で異なっていたことは、イネの染色体への導入遺伝子導入箇所がそれぞれ異なることを示すものであり、植物体内でのバクテリアの残存

によるものではないことが確認された。  
形質転換体当世代植物のハイグロマイシン抵抗性を調査したところ、対照品種の種子では、ほとんど発芽を示さないかもしくは発芽後の生育は著しく阻害された。これに対し、形質転換体から得られた種子の多くは、正常な発芽と生育を示した(表8、表9)。また、これらのハイグロマイシン抵抗性個体は、Q5遺伝子の発現も認められた。多くの系統ではハイグロマイシン抵抗性、Q5遺伝子の発現とも1因子分岐には適合する遺伝的分岐を示した。表8における「朝の光」の形質転換系統1-2および3-2は、分岐比から2因子以上の導入遺伝子の存在が推測されるが、サザン解析の結果も2因子分岐に適合していた。表8の2-1の形質転換個体では、2コピーの導入遺伝子の存在が推測されたが、このうちの1本のバンドは5kbより短い断片であり、T-DNAが不完全な形で組み込まれたものと推測される。従って、この個体は次世代でハイグロマイシン抵抗性について1因子分岐の分離を示したものと考えられる。

表9では「月の光」の形質転換系統の多くが、次世代でハイグロマイシン抵抗性およびQ5遺伝子の発現について1因子分岐の分離を示した。しかし、当代のサザン解析では一部の個体が1コピーであったのは、複数のコピー数を示した。形質転換当世代のサザン解析により、導入遺伝子が1コピーであった18および22コピーであった16の次世代2系統について、Q5遺伝性、Q5増殖性、ハイグロマイシン抵抗性の各個体を2個体ずつ供試し、サザン解析を行った。その結果、Q5増殖性の個体を除くすべての個体で、形質転換当世代の個体と同一のバンドが検出され、導入遺伝子が形質転換次世代に遺伝していることが示された。2コピーの導入遺伝子を持つ系統16について、Q5増殖性およびハイグロマイシン抵抗性の各

次世代個体で、いずれも同一な2コピーの導入遺伝子を持っていたことは、同一の染色体または遺伝子座に複数の遺伝子が組み込まれたことを示唆するものである。これらの結果は、アグロバクテリウムによりイネに導入された導入遺伝子が、植物細胞の核に組み込まれ、メンデルの法則に従って、後代に遺伝したことを示すものである。

表8 サザン親所による形質転換

形質転換株	対照	次世代個体数				Q5発現
		ハイグロマイシン感受性	低感受性	感受性	感受性	
1-2	1	0	60	0	0	20
2-1	2	30	0	0	19	1
3-2	2	64	26	13	5	5
		59	1	19	1	

\*2 コピーの導入遺伝子のうち一つのは制限断片が短く、導入遺伝子は不完全。

表9 サザン親所による形質転換

体における導入遺伝子のコピー数および形質転換世代における導入遺伝子の発現(品種: 月の光)

形質転換株	対照	次世代個体数				Q5発現
		ハイグロマイシン感受性	低感受性	感受性	感受性	
1a	1	0	60	0	0	20
2a	2	48	26	15	5	5
2b	2	33	18	13	5	5
2c	2	31	9	15	5	5
3	2	22	10	16	3	7
4a	3	22	21	13	7	
4b	3	48	11	16	3	
5a	3	26	13	17	3	
5b	3	38	14	17	3	
5c	3	24	9	17	2	
6	2	47	13	—	—	
7	1	56	20	14	5	
8	4	45	22	—	—	
9	1	52	18	18	2	
10	4	53	10	—	—	
11	2	75	15	18	2	
12	3	44	7	14	6	
13a	2	33	18	15	5	
13b	2	32	8	13	7	
14a	1	72	20	15	5	
14b	1	28	14	10	10	
15	1~2	22	7	12	8	
16a	2	31	10	15	2	
16b	2	32	8	14	3	
16c*	2	69	24	13	7	

T. and Skoog, F. 1962; Physiol. Plant. 15: 473-497. 0.1m q/1カバネチン, 1.0mq/1カバネチン, 2.3q/1カバネチン)に移植し、25°C、暗所で2~3日間培養した。その後、25mq/1セフォキシンを含む滅菌水で洗浄し、同濃度のセフォキシンを含む5個体培地で培養を続けた。

(7) カルスへの接種、培養条件

カルスを前述のアグロバクテリウム懸濁液に約5日間浸漬後、実施例1に示したアセトリンゴンを含む26個体培地に移植し、25°C、暗所で3日間共同培養をおこなった。その後カルスを25mq/1セフォキシンを含む滅菌水で洗浄し、同濃度のセフォキシンおよび30mq/1ハイハイマイシンを含むLSD1 5個体培地で培養を続け、系質転換カルスの選抜を行った。

(8) Q5活性の調査方法

共同培養処理直後の茎頂組織およびカルス、その後培養を継続した茎頂組織およびカルスについて実施例1の方法によりQ5活性を調査した。

(9) 茎頂組織への遺伝子導入

Guidesの報告 (Guid J., et al. 1991; Plant Physiol. 1.95: 426-434) による生長点組織 (茎頂組織) を材料とした形質転換が可能である事を確認するため、前述のアグロバクテリウム菌系EHA101 (pG1211m) を単離した茎頂組織に処理し、生長した植物体でのQ5活性を調査した。アグロバクテリウム非処理の組織では、いずれもQ5遺伝子の発現はみられなかったが、アグロバクテリウム処理した組織では針で穿刺した部分にQ5遺伝子の発現が小さな点状に認められた。しかし、その後培養を続け植物体でQ5活性を調査したところ、Q5遺伝子の発現を示すものは全くなかった。生長点近傍は非常に微細な組織であり、そこに穿刺したアグロバクテリウムを感染させることは容易でない。本実験の結果から生長点近傍へのアグロバクテリウムによる形質転換には生長点の切り出し、穿刺などに熟練した技術が必要であると考えられた。

表10 トウモロコシ茎頂組織への遺伝子導入

実験	供試組織	茎頂の伸長した組織数	得られた植物体数	Q5発現のみの植物体数
1	24	9	2	0
2	16	8	6	0
3	17	13	5	0
4	14	1	0	0
5	45	14	7	0

供試組織	茎頂の伸長した組織数	得られた植物体数	Q5発現のみの植物体数
6	32	14	8
7	30	7	1

供試組織はいずれもP3732

(10) トウモロコシの品種および供試菌株による遺伝子導入効率の違い

供試したいずれの品種でも高頻度でQ5遺伝子の発現がみられた。EHA101 (pG1211m), LB4404 (pTQ232) の菌株間での遺伝子発現効率の違いは認められなかった(表10)。処理カルスに対するQ5染色部位の大きさも10%以上のものが多く、広範囲の組織で遺伝子発現が示された。供試したアグロバクテリウムのハイハイベクタ-pG1211mおよびpTQ232はQ5遺伝子中にヒモのイントロンが介在しているため、アグロバクテリウムの細胞の中ではQ5遺伝子が発現しない。このことから、トウモロコシのカルスにおいて認められたQ5遺伝子の発現は、アグロバクテリウムにより高頻度で遺伝子導入が行われたことを示すものである。共同培養後、ハイグロマイシンを含む固体培地で培養することにより、供試カルスの一部でコンバクトでこの状態のカルスが検出された。増殖した組織はQ5遺伝子の発現を示したことから、形質転換組織であると認められる。これらのコンバクトでこの状態の形質転換カルスはLupottoの方法 (Lupotto, E. and Usardi, M. C. 1988; Maydica XXXII: 163-177) により再分化可能である。

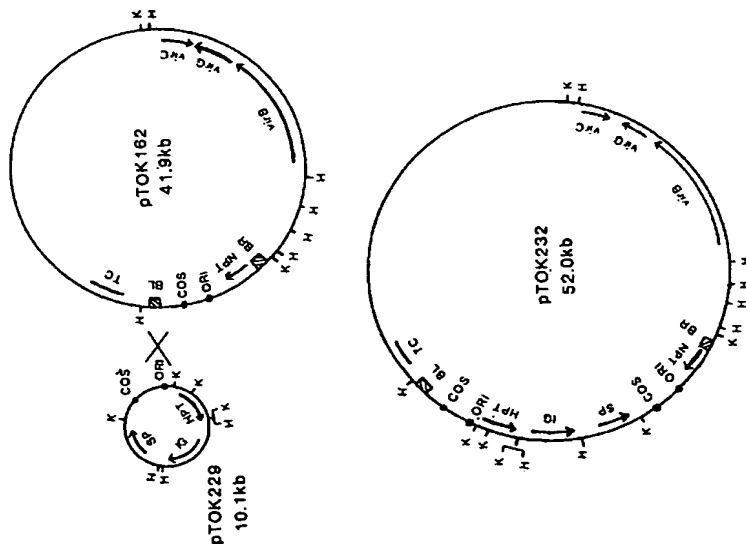
表11 トウモロコシカルスへのQ5遺伝子の導入効率

品種	菌株	Q5のカルス発/処理カルス数 (%)
A188	1	32/35(91)
A188	1	34/34(100)
A188-Q5S	1	41/48(84)
A188-Q73	1	35/42(83)
A188	2	39/40(98)
A188	2	40/40(100)
A188-Q5S	2	39/40(98)
A188-Q73	2	31/40(78)
B73-A188	2	29/35(83)

BMS: Black Mexican Sweet

菌株1: EHA101(pG1211m); 2: LB4404(pTQ232)

【第1図】



フロントページの続き

- (56) 参考文献 国際公開91/2071 (WO, A1)  
 国際公開92/9696 (WO, A1)  
 BIO/TECHNOLOGY, 8  
 (1990) P. 33-38  
 Proc. Natl. Acad. Sc  
 i. USA, 88 (1991) P. 10426-  
 10430  
 Plant Cell Report  
 s, 9 (1990) P. 303-306  
 青森, 44 [別1] (1994) P. 52